

**CATHEPSINE D
DANS LE TISSU CONJONCTIF
ET L'EPITHELIUM
DE GENCIVES HUMAINES ENFLAMMEES**

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

Hubert JOTTERAND

de

BIERE (Vaud)

Thèse No 331

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1977

**CATHEPSINE D
DANS LE TISSU CONJONCTIF
ET L'EPITHELIUM
DE GENCIVES HUMAINES ENFLAMMEES**

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

Hubert JOTTERAND

de

BIERE (Vaud)

Thèse No 331

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1977

La Faculté de médecine, sur le préavis de Monsieur le professeur Giorgio Cimasoni, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 24 février 1977

Le Doyen :
Marcel Jenny

Thèse No 331



Pour mener à bien ce travail, nous avons bénéficié des précieux conseils ainsi que de l'active collaboration de plusieurs personnes, dont l'amabilité et la disponibilité nous furent autant d'encouragements. Nous souhaitons leur en exprimer ici notre plus vive reconnaissance.

Que soient tout particulièrement remerciés :

le professeur G. Cimasoni, qui a bien voulu diriger ces recherches et nous aider de ses judicieuses critiques.

Madame I. Condacci, pour avoir effectué, avec soin et minutie, les analyses biochimiques ainsi que les calculs statistiques.

Mademoiselle E. Andersen, qui s'est chargée des travaux d'histologie et de la réalisation des photos.

Madame M. Rénier, pour avoir eu l'obligeance de dactylographier le texte sous sa forme définitive.

Monsieur R. Pasquier, pour la mise à net des graphiques.

Le présent travail a bénéficié de l'aide financière du Fonds National de la Recherche Scientifique (No 3.604—0.75)

A VOUS, MES PARENTS, en témoignage de reconnaissance

A TOI, MA FEMME

1. Introduction

=====

La cathepsine D fait partie du contenu enzymatique des lysosomes. Ces derniers ont été définis par DE DUVE (14) comme étant "des organelles intracellulaires ressemblant à de petits sacs remplis d'une gouttelette de suc digestif très puissant, capable de dégrader la plupart des constituants de la matière vivante".

Les enzymes lysosomales, agissant toutes en milieu acide, sont synthétisées dans les ribosomes du reticulum endoplasmique rugueux; elles sont ensuite stockées dans les lysosomes dont la membrane possède la faculté, encore inexploitée, de résister à leur action lytique. Les lysosomes appartiennent en fait au "système digestif" de la cellule : leur fusion avec les phagosomes, vacuoles phagiques ne possédant pas de système enzymatique, donne naissance à une vacuole digestive, ou lysosome secondaire. Au sein de ce corpuscule commence alors la dégradation de matériel intracellulaire (déchets métaboliques) ou extracellulaire (bactéries, complexes antigènes-anticorps, etc.). (1 ; 15).

Ainsi, à l'intérieur des leucocytes polynucléaires, des macrophages ou d'autres cellules capables de phagocyter, les lysosomes participent activement à la défense de l'organisme en détruisant les bactéries que ces cellules ont ingérées.

Lors de réactions inflammatoires (4) ou immunologiques (28; 65), le plus souvent lors d'une combinaison de ces deux processus, les enzymes lysosomales peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire. WEISSMANN, ZURIER et HOFFSTEIN (65) ont décrit quatre mécanismes de libération extracellulaire de ces enzymes :

1- Le premier est représenté par la mort de la cellule, que ce soit par simple vieillissement, par action de toxines ou encore par destruction des membranes sous l'effet d'agents physiques (congélation-réchauffement, par exemple) ou chimiques.

2- Le second mécanisme, relativement rare, serait à l'origine de maladies telles que la goutte et la silicose. De petits cristaux pénètrent à l'intérieur des lysosomes et provoquent une "perforation par l'intérieur", dont le résultat correspond à l'hypothèse du "sac suicide" de DE DUVE (14).

3- Lors de la phagocytose de complexes anticorps-antigènes circulants, nous assistons au troisième mécanisme de libération des enzymes lysosomales : la "régurgitation". Au moment de la formation d'un phagosome et avant que celui-ci ne soit refermé, il peut être simultanément abordé par un lysosome primaire.

Les enzymes de ce lysosome secondaire nouvellement formé pourront alors s'échapper vers l'espace extracellulaire.

4- L'"endocytose inverse" constitue le quatrième mécanisme : lorsqu'une cellule capable de phagocyter arrive au contact d'une surface solide recouverte de complexes anticorps-antigènes, ses lysosomes primaires sont attirés vers la membrane cellulaire et déchargent leur contenu enzymatique à l'extérieur.

Si les lysosomes jouent un rôle très important dans les processus physiologiques (15, 16), il est indéniable qu'ils sont impliqués également dans bon nombre d'évolutions pathologiques (32, 24, 65, 1, 63). En ce qui nous concerne plus particulièrement, il est probable que les enzymes lysosomales puissent faciliter le développement d'une parodontite : GUSTAFSON (24) a constaté que des visons souffrant d'anomalie lysosomale développent plus facilement une parodontite que des animaux sains. Pour leur part, après avoir déterminé la concentration en phosphatase acide, hyaluronidase et protéase dans les culs-de-sac de gencives enflammées chez le chien, TYNELIUS-BRATTHALL et ATTSTROM (59) ont montré que les taux d'activité de ces enzymes diminuaient lors du rétablissement de la santé gingivale.

Dans le fluide gingival humain, les taux d'activité de diverses enzymes lysosomales ont été déterminés en rapport avec la gravité de l'atteinte parodontale; ISHIKAWA, CIMASONI et AHMAD-ZADEH (34) ont montré une corrélation positive entre l'activité de la cathepsine D dans le fluide gingival et la profondeur des poches parodontales.

Dans des solutions de rinçage de la gencive marginale, les activités de la β -glucuronidase, de la cathepsine D et de la phosphatase acide se sont révélées proportionnelles au degré de l'inflammation gingivale (5, 6). Lors d'expériences de ce genre, des enzymes d'origine bactérienne peuvent rendre difficile l'interprétation des résultats (57). En revanche, les recherches enzymatiques effectuées sur du tissu gingival éliminent pratiquement tout problème de contamination bactérienne. Dans des gencives humaines, RAPP et ORZOLEK (51) ont constaté une élévation du taux d'activité des protéases neutres par rapport à la sévérité de l'inflammation gingivale. Récemment, HASEGAWA, CIMASONI et VUAGNAT (27) ont mis en évidence, dans des gencives enflammées, une libération extralysosomale d'enzymes (phosphatase acide, β -glucuronidase et cathepsine D) en relation positive avec le degré d'inflammation gingivale.

En ce qui concerne l'épithélium, CORNAZ, CIMASONI et PATAKI (13) ont constaté une diminution de l'activité de la phosphatase

acide, à l'intérieur des cellules épithéliales desquamant dans le sillon gingivo-dentaire, lorsque l'inflammation augmentait. Ceci semble donc prouver une libération extracellulaire de cette enzyme lysosomale à partir de l'épithélium, parallèlement à la dégradation de la santé gingivale.

La cathepsine D est une protéase glycoprotéinique intracellulaire dégradant des substrats de poids moléculaire élevé en milieu acide (7,35). Par son type d'activité catabolique, elle se range dans la classe des "protéinases acides" (25), dont la pepsine est l'exemple le plus connu. Plusieurs isoenzymes de la cathepsine D ont été décrites, et BARRETT (8) en distingue, dans le foie de poulet et le foie humain, trois formes principales, d'un poids moléculaire identique de 45'000.

La cathepsine D se trouve dans pratiquement tous les tissus (9,14,22,30,31,32,38,52,53,55,66) et participe de façon très active aux processus cataboliques intra- et extra-cellulaires. SAPOLSKY, ALTMAN, WOESSNER et HOWELL (53) ont découvert que l'activité de la cathepsine D était deux à trois fois plus élevée, par rapport au poids de protéines, dans le cartilage ulcéré que dans le normal. WOESSNER Jr (67) affirme que la principale activité protéolytique dans la dégradation autolytique de la matrice du cartilage peut être attribuée à la cathepsine D. In vitro, DINGLE, BARRETT et WESTON (17) ont montré que l'autolyse du cartilage pouvait être inhibée à 90 % par l'adjonction d'un antisérum spécifique à la cathepsine D. Cette enzyme intervient également dans les processus physiologiques d'involution, par exemple dans l'utérus post-partum (66) ou dans la queue du têtard lors de sa disparition (62). Dès qu'un processus inflammatoire aigu ou chronique se développe, par exemple dans un granulome induit chimiquement (22) ou encore dans un tissu de granulation post-traumatique (9), la cathepsine D joue un rôle primordial dans le rétablissement d'une situation physiologique par dégradation des complexes protéiniques excédentaires.

Gingivite et parodontite sont en fait des réponses inflammatoires ou immunitaires de l'organisme vis-à-vis des micro-organismes de la plaque dentaire (40,43,58). Il est concevable que les cellules de défense de l'organisme, en libérant leurs enzymes lysosomales (65), ne contribuent plus à rétablir une situation physiologique, mais provoquent des dommages tissulaires conduisant à un affaiblissement des structures parodontales (48).

Le but du présent travail est d'étudier les variations de l'activité spécifique de la cathepsine D dans la gencive humaine en fonction de son inflammation, et particulièrement d'établir si la quantité de cathepsine D augmente relativement au nombre de cellules.

2. Matériel et méthodes

=====

Les biopsies utilisées dans la présente étude ont été prélevées à l'occasion d'extractions d'une ou plusieurs dents antéro-supérieures de 10 patients dont l'âge variait entre 45 et 70 ans.

Afin d'éviter tout changement des paramètres cliniques gingivaux, les sujets ne reçurent aucune instruction d'hygiène buccale avant l'extraction. Deux parties, longues de 3-4 mm et larges de 1-2 mm, de gencive marginale, une vestibulaire et une palatine, ont été prélevées, après enregistrement, dans la zone de biopsie et avant l'anesthésie, du degré d'inflammation gingivale, du débit du fluide gingival et de la profondeur des poches parodontales. Les biopsies ont rapidement été congelées au moyen de glace sèche, puis coupées dans un cryostat à une épaisseur de 200 microns, et immédiatement lyophilisées. Trois coupes de 15 microns ont été prélevées de chaque biopsie afin d'être colorées à l'Hématoxyline-éosine. Pour les analyses biochimiques, les parties vestibulaires et palatines de gencive ont été rassemblées pour chaque patient, dans le but de disposer de suffisamment de matériel.

2.1. Paramètres cliniques

2.1.1. Indice d'inflammation gingivale

Le degré d'inflammation de la gencive a été mesuré selon la méthode de LOE et SILNESS (42) :

- | | |
|-------------------------------------|---|
| 0 = pas d'inflammation (clinique) : | gencive normale, rose pâle, ferme, finissant en lame de couteau au collet de la dent. |
| 1 = légère inflammation : | léger changement de couleur, léger oedème, pas de saignement au sondage. |
| 2 = inflammation moyenne : | rougeur, oedème, saignement au sondage. |
| 3 = inflammation sévère : | rougeur et oedème importants, tendance au saignement spontané, parfois légère ulcération. |

Quatre mesures (une à chaque extrémité mésiale et distale des zones de biopsie vestibulaires et palatines) ont été réalisées,

dont la somme divisée par quatre a donné l'indice gingival moyen d'un échantillon d'analyse.

2.1.2. Mesure du débit du fluide gingival

Le débit du fluide gingival, reflétant le degré d'inflammation de la gencive, a été mesuré selon la technique intracrêvulaire standardisée par VALAZZA, MATTER, OGILVIE et CIMASONI (60), à l'aide de languettes de papier-filtre insérées pendant trois minutes dans le sillon gingivo-dentaire à une profondeur de 1 mm. Les prélèvements, au nombre de quatre par dent, ont été effectués aux endroits mêmes où les mesures de l'indice gingival allaient être prises, en évitant toute contamination par la salive. A cet effet, les dents ont été isolées au moyen de cotons et séchées pendant dix secondes à l'air comprimé froid. Les languettes ont été pesées dans un microtube en plastique avant et après collection. La différence de poids, divisée par le temps de collection, a donné le débit, exprimé en mg/min.

2.1.3. Profondeur des poches

La profondeur des poches parodontales a été mesurée au moyen d'une sonde parodontale fine et graduée, aux endroits mêmes où le fluide avait été prélevé. Les quatre mesures prises ainsi autour de chaque dent ont permis le calcul d'une profondeur moyenne de poches, par dent, exprimée en millimètres.

Il faut noter que l'indice d'inflammation gingivale et la profondeur des poches ont été relevés seulement après le prélèvement du fluide gingival. En effet, la mesure de ces deux paramètres peut causer un saignement et une contamination du fluide prélevé ultérieurement.

2.2. Analyses biochimiques des tissus gingivaux

Dans le but d'analyser séparément l'épithélium et le tissu conjonctif, chaque coupe de 200 microns - environ 400 coupes au total - a été séparée en trois parties au moyen d'un scalpel et sous une loupe binoculaire, la topographie tissulaire étant vérifiée à l'aide des coupes colorées à l'Hématoxyline-éosine.

Chaque biopsie a ainsi été séparée en trois parties : une zone superficielle (A) comprenant presque uniquement du tissu épithélial, une zone moyenne (B) constituée d'un mélange de digitations épithéliales et conjonctives et une zone profonde (C) formée exclusivement de tissu conjonctif (voir page 10).

Pour les analyses biochimiques, seules les parties A et C ont été utilisées, représentant, la première uniquement du tissu épithélial, la seconde uniquement du tissu conjonctif.

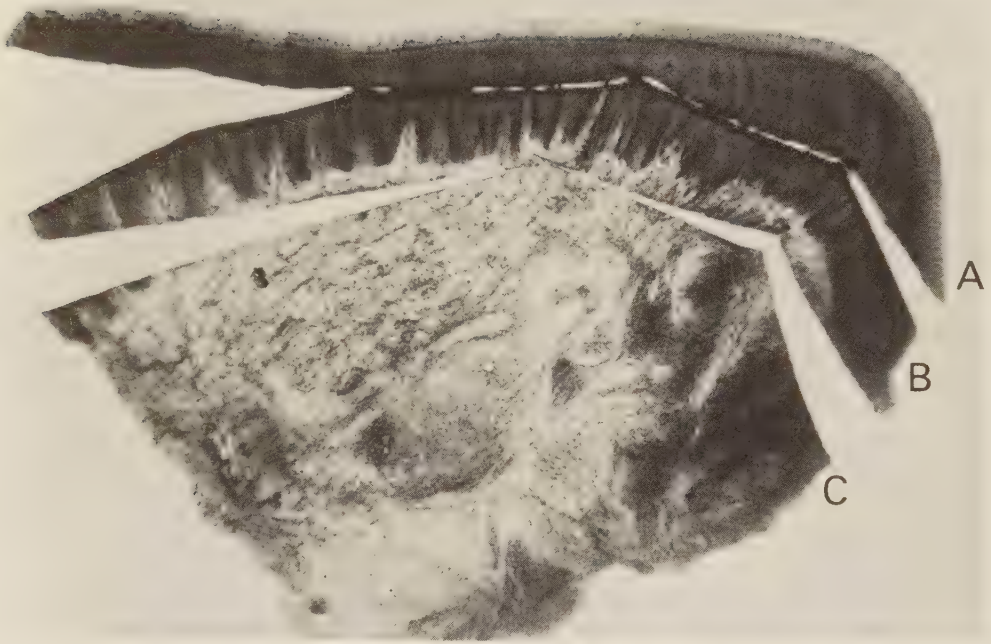


Photo d'une coupe de gencive au cryostat (100μ), non lyophilisée et colorée à l'hématoxyline-éosine, montrant les deux traits de scalpel qui délimitent les parties A,B et C. (Grossissement 25 x)

Partie A : tissu épithélial

Partie B : mélange de digitations épithéliales et conjonctives

Partie C : tissu conjonctif

Après avoir été pesés, les échantillons tissulaires ont été homogénéisés dans un tampon Mc-Ilvaine à pH 3,5 au moyen d'un homogénéisateur Potter et Elvehjem, mû par un moteur électrique et placé dans de l'eau glacée, auquel on imprimait un mouvement de haut en bas toutes les 30 secondes, cela pendant 6 minutes.

2.2.1. Détermination de l'activité de la cathepsine D

Pour la détermination de cette protéase acide, nous avons utilisé la méthode de ANSON (2), adaptée à nos besoins par ISHIKAWA, CIMASONI et AHMAD-ZADEH (34) et basée sur l'hydrolyse à pH 3,5 par la cathepsine D de l'hémoglobine dénaturée à l'acide.

0,2 gr d'hémoglobine bovine ont été mélangés à 10 ml d'une solution 0,1 M d'acide citrique durant 1 heure pour obtenir un pH de 2,2. La solution d'hémoglobine ne devait laisser, après une heure de mélange, aucun dépôt au fond de l'erlenmeyer. Afin d'amener la solution d'hémoglobine à un pH final de 3,5 (pH optimal pour l'activité de la cathepsine D), nous lui avons ajouté, dans une proportion de 1:1, du tampon Mc-Ilvaine à pH 4,9.

L'analyse de l'homogénat de gencive a été menée parallèlement à celle d'une solution de contrôle (blanc) ; 1,5 ml de la solution de substrat au pH de 3,5 (solution d'hémoglobine + tampon Mc-Ilvaine) ont été mélangés à 500 microlitres d'homogénat et placés au bain-marie à 37°C pour une incubation d'une heure. La réaction a été bloquée par l'adjonction de 2,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) 0,3 N dont la température était de 4°C. Le TCA cause la précipitation de l'hémoglobine non dégradée par la cathepsine et restant dans l'homogénat.

En même temps, pour ce qui concerne le "blanc", 1,5 ml de la solution de substrat au pH de 3,5 ont été également placés pour une heure au bain-marie à 37°C. Puis on y a ajouté 2,5 ml de TCA à une température de 4°C. Après le traitement de la solution par le TCA, 100 microlitres d'homogénat ont été ajoutés à ce mélange.

Les solutions finales, "analyse" et "blanc", ont été ensuite filtrées à la température de 4°C. Les produits de dégradation de l'hémoglobine contenus dans le filtrat des deux solutions ont été déterminés par absorption dans l'ultraviolet (280 millimètres) au moyen d'un photomètre Beckmann DU. L'activité enzymatique a ainsi été déterminée par la différence d'absorption de la solution d'analyse et de la solution de contrôle. Pour obtenir une activité spécifique, cette différence d'absorption a été

exprimée par rapport à une quantité donnée d'acide désoxyribonucléique.

La fiabilité de la méthode a été vérifiée par une série de six analyses, réalisées simultanément à partir d'un même homogénat-témoin. Les résultats s'étant avérés identiques (coefficient de variation $\ast = 3.0 \%$), nous avons pu, vu la faible quantité de matériel disponible, nous limiter par la suite à deux analyses par biopsie et en prendre la moyenne.

Les analyses ont été effectuées en présence de Triton X-100 à la concentration de 0,1 % dans le but de mesurer l'activité totale de la cathepsine D (HASEGAWA et CIMASONI, 26).

2.2.2 Détermination de la concentration en acide désoxyribonucléique (ADN)

La concentration en ADN dans les échantillons de gencive a été déterminée par la méthode de KISSANE et ROBINS (36). La réaction employée est une modification de la synthèse de quinaldine selon Doebner-Miller, par laquelle les aldéhydes du type $R-CH_2-CHO$ (ADN) engendrent des produits très fluorescents lorsqu'on les fait réagir avec de l'acide 3,5, diamino-benzoïque (DABA), dans des conditions d'échauffement prolongé en milieu fortement acide.

Préalablement, les lipides ont été éliminés par l'adjonction de 50 microlitres de TCA 0,6 N aux 20 microlitres d'homogénat destinés à l'analyse. Ce mélange a été centrifugé pendant 5 min à 2000 tours / min. Environ 50 microlitres de surnageant ont été ensuite retirés et éliminés. Puis nous avons ajouté 100 microlitres de solution alcoolique d'acétate de potassium (0,1 N) et nous avons laissé reposer le tout pendant 10 min à température ambiante. Le mélange a été à nouveau centrifugé et 100 microlitres de surnageant ont été éliminés. Après adjonction de 100 microlitres d'alcool absolu, l'éprouvette a été couverte de parafilm et chauffée à 60°C pendant 20 min. Le tout a été recentrifugé et 100 microlitres de surnageant ont été retirés. Nous avons encore une fois ajouté 100 microlitres d'alcool absolu, centrifugé le mélange et retiré tout le surnageant. Finalement, le précipité a été séché dans un dessiccateur.

$\ast$ Coefficient de variation : déviation standard exprimée en pourcentage de la moyenne des six mesures.

Le précipité, contenant l'ADN de l'homogénat, a été ajouté à 100 microlitres d'acide diamino-benzoïque fraîchement préparé (0,3 g DABA pur dans 1 ml HCL 4,0 N). Le tout a été énergiquement agité. Puis, l'éprouvette ayant été recouverte de parafilm, le mélange a été chauffé à 60°C pendant 30 min. 2 ml d'acide perchlorique (APC) 0,6 N ont été ensuite ajoutés et mélangés.

Une solution-témoin sans ADN (blanc) a subi le même traitement.

Simultanément, nous avons pratiqué l'analyse avec des quantités standard et décroissantes d'ADN (ADN de thymus de veau, type III, Sigma Chemical Company, St-Louis), de façon à établir une courbe standard de la fluorescence de l'acide désoxyribonucléique.

La fluorescence a été lue dans un fluoro-colorimètre AMINCO 4-7440, en comparaison avec le blanc. La quantité d'ADN de la solution d'analyse a été exprimée en $\mu\text{g/ml}$.

3. Résultats

=====

3.1. Relations entre les paramètres cliniques

Les relations entre les différents paramètres cliniques considérés dans cette étude sont identiques à celles décrites précédemment par VALAZZA et coll. (60), et nous nous contenterons de les rappeler sans représentation graphique.

Concernant tout d'abord le débit du fluide gingival en fonction de l'indice d'inflammation gingivale (G.I.), nous avons confirmé l'existence d'une corrélation positive et significative entre ces deux paramètres. En effet, le coefficient de corrélation r trouvé dans ce cas était de + 0,84 avec un niveau de probabilité p inférieur à 0,001.

Quant au débit du fluide gingival en fonction de la profondeur des poches parodontales, on n'a, dans ce cas, pas trouvé de corrélation statistiquement valable ($r = + 0,16$).

Enfin, nous avons constaté que la corrélation entre le degré de l'inflammation gingivale et la profondeur des poches était également non significative ($r = + 0,09$).

3.2. Activité spécifique de la cathepsine D, avec l'acide désoxyribonucléique comme base de référence, en relation avec l'état parodontal

3.2.1. Corrélation cathepsine D - indice d'inflammation gingivale

Les graphiques Nos 1 et 2 montrent l'évolution de l'activité spécifique de la cathepsine D dans le tissu conjonctif, respectivement épithélial, en rapport avec l'indice d'inflammation gingivale (G.I.). Dans le tissu conjonctif, nous avons constaté une élévation très significative de l'activité spécifique de la cathepsine D en fonction du G.I. (graphique No 1), avec un coefficient de corrélation r de + 0,85 et un niveau de probabilité inférieur à 0,001.

Dans l'épithélium, au contraire, on a observé une légère diminution, non significative, de l'activité spécifique de la cathepsine D ($r = - 0,49$), en fonction du G.I.

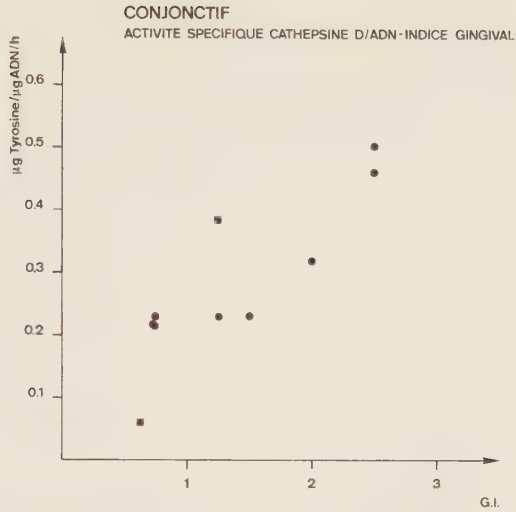


Fig.1. Ce graphique représente la corrélation positive et significative existant entre l'activité spécifique de la cathepsine D dans le tissu conjonctif et l'indice d'inflammation gingivale (G.I.). En ordonnée est indiquée l'activité spécifique de l'enzyme par rapport à l'ADN, et en abscisse l'indice d'inflammation gingivale (G.I.).

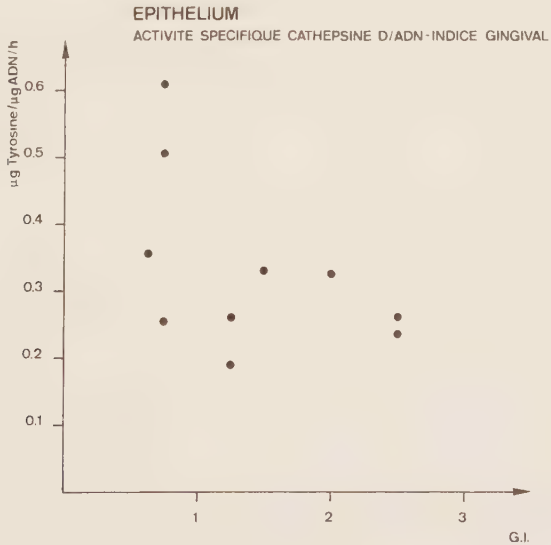


Fig.2. Corrélation entre l'activité spécifique de la cathepsine D dans l'épithélium et l'indice d'inflammation gingivale (G.I.). Le coefficient de corrélation r est négatif et non significatif. L'axe des ordonnées donne l'activité spécifique de la cathepsine D par rapport à l'ADN, tandis que l'axe des abscisses donne l'indice d'inflammation gingivale (G.I.).

3.2.2. Corrélation entre l'activité spécifique de la cathepsine D et le débit du fluide gingival

La variation de l'activité spécifique de la cathepsine D, toujours avec l'acide désoxyribonucléique (ADN) comme base de référence, en fonction du débit du fluide gingival apparaît dans les graphiques No 3 pour le tissu conjonctif et No 4 pour le tissu épithélial. Nous avons trouvé, avec le fluide gingival, le même type de variation d'activité enzymatique qu'avec le degré de l'inflammation gingivale. Dans le tissu conjonctif, on a relevé un résultat positif et significatif, le coefficient de corrélation r atteignant + 0,84 et le niveau de probabilité p étant inférieur à 0,001.

Dans l'épithélium, en revanche, nous avons constaté que la corrélation entre ces mêmes paramètres était négative, mais non significative, au niveau de 5 % ($r = - 0,43$).

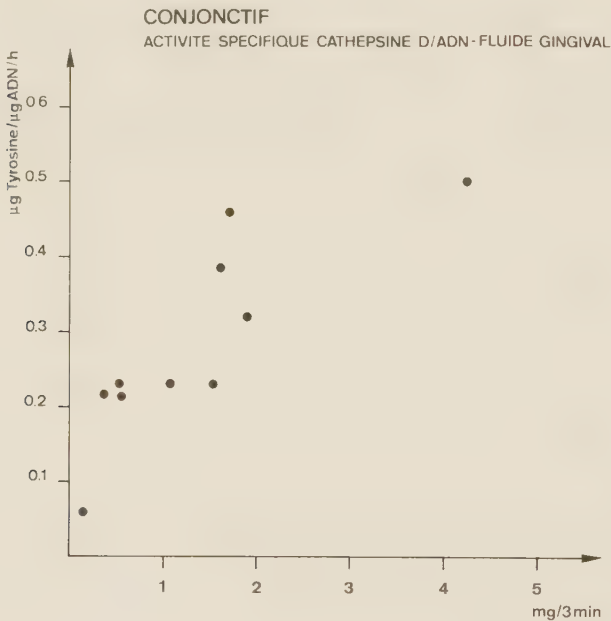


Fig. 3. Corrélation positive entre l'activité spécifique de la cathepsine D dans le tissu conjonctif et le débit du fluide gingival.

L'axe des ordonnées indique l'activité spécifique de la cathepsine D par rapport à l'ADN et l'axe des abscisses le débit du fluide gingival exprimé en mg/ 3 min.

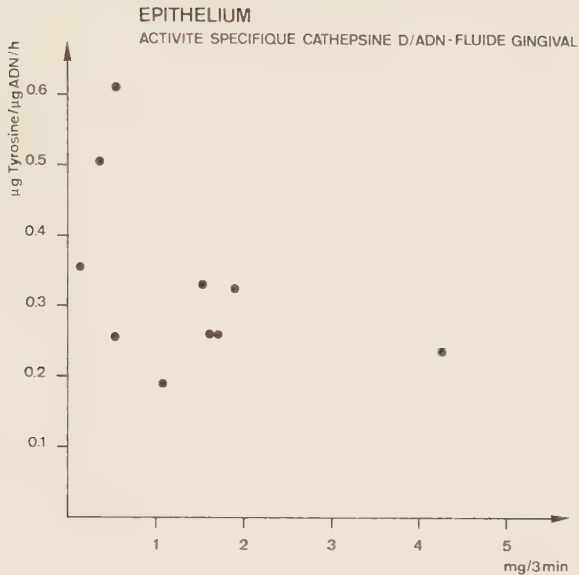


Fig.4. Ce graphique illustre le très faible degré de corrélation relevé entre l'activité enzymatique spécifique dans l'épithélium et le débit du fluide gingival. En ordonnée est représentée l'activité spécifique de la cathepsine D par rapport à l'ADN, en abscisse le débit du fluide gingival exprimé en mg/ 3 min.

3.2.3. Activité spécifique de la cathepsine D et profondeur des poches

L'activité de la cathepsine D / ADN dans le tissu conjonctif, de même que dans le tissu épithélial, a également été examinée en relation avec la profondeur des poches parodontales. Il s'est avéré, comme en témoignent les graphiques Nos 5 et 6, qu'il n'existait pas de corrélation significative entre ces deux paramètres, tant dans le tissu conjonctif que dans l'épithélium. On a en effet obtenu un coefficient de corrélation r de + 0,217 pour le tissu conjonctif et de - 0,33 pour l'épithélium.

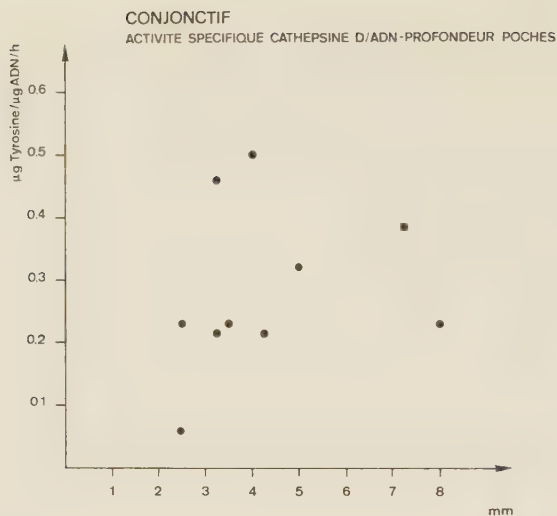


Fig.5. Corrélation non significative entre l'activité spécifique de la cathepsine D dans le tissu conjonctif et la profondeur des poches parodontales.

L'activité enzymatique /ADN est reportée en ordonnée et la profondeur des poches, mesurée en mm, en abscisse.

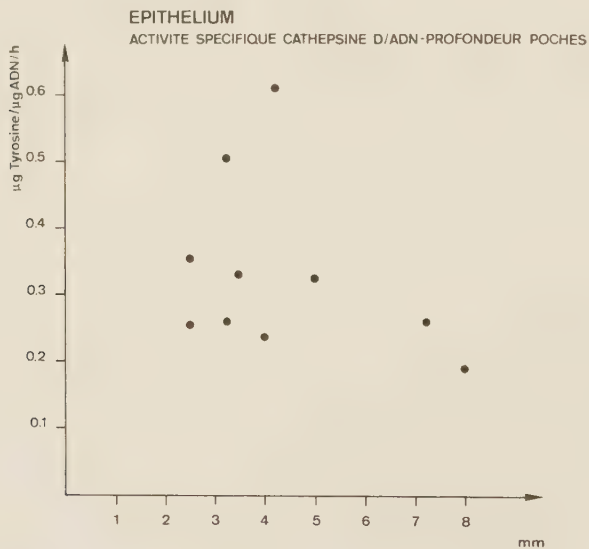


Fig.6. Le graphique no 6 fait apparaître la corrélation non significative entre l'activité spécifique de la cathepsine D dans l'épithélium et la profondeur des poches parodontales.

L'activité spécifique /ADN est donnée par l'axe des ordonnées; la profondeur des poches, mesurée en mm, est indiquée en abscisse.

3.3. Activité spécifique de la cathepsine D, avec le poids sec de gencive comme base de référence, en relation avec l'état parodontal

Lorsque l'activité de la cathepsine D a été exprimée en fonction du poids sec de tissu, une corrélation positive et significative ($r = + 0,75$; $p < 0,01$) a été obtenue entre ce paramètre au niveau du tissu conjonctif et le débit du fluide gingival (graphique No 7). Ce résultat a été partiellement confirmé par la corrélation positive mais insuffisamment significative constatée entre cette même activité spécifique de l'enzyme et l'indice G.I. ($r = + 0,45$), toujours pour le conjonctif.

Au contraire, en ce qui concerne le tissu épithélial, l'activité spécifique de la cathepsine D (par mg de tissu) ne montrait de corrélation ni avec le G.I. ni avec le débit du fluide.

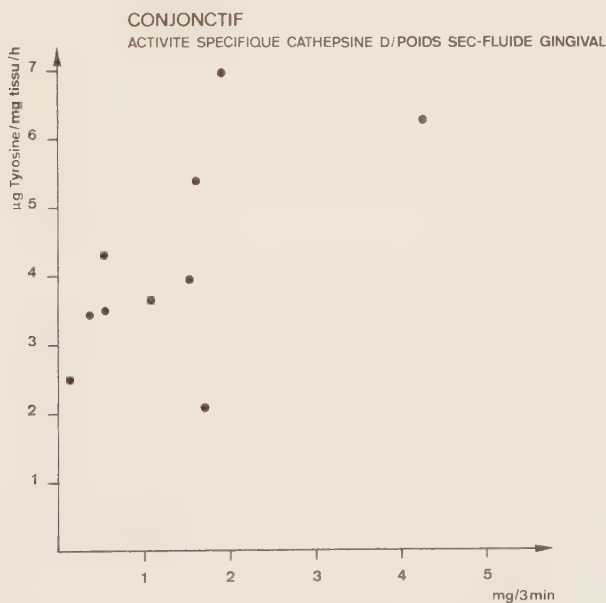


Fig. 7. Corrélation positive et significative entre l'activité spécifique de la cathepsine D par rapport au poids sec de tissu dans le conjonctif et le débit du fluide gingival. L'activité enzymatique / mg de tissu figure en ordonnée, le débit du fluide gingival, exprimé en mg / 3 min., en abscisse.

3.4. Relation entre l'activité spécifique de la cathepsine D dans le tissu conjonctif et celle de la cathepsine D dans l'épithélium, avec l'ADN comme base de référence

Du fait que la corrélation entre l'activité de la cathepsine D / ADN et la gravité de la gingivite était positive pour le tissu conjonctif et négative pour l'épithélium, l'évolution de l'activité enzymatique a été comparée dans les deux tissus (graphique No 8). Cette analyse a révélé qu'il n'existait pas de corrélation significative entre l'activité spécifique de l'enzyme dans l'épithélium et celle du conjonctif ($r = - 0,41$).

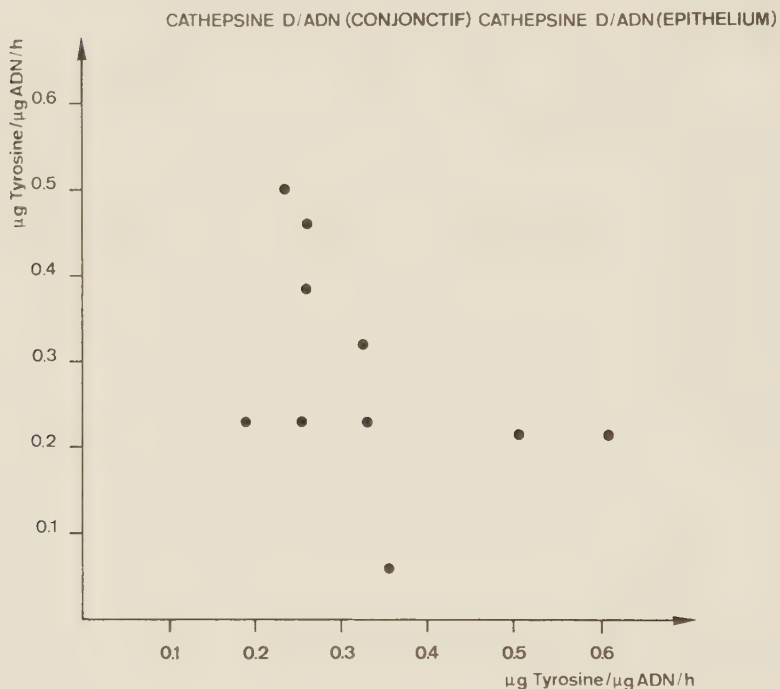


Fig.8. Corrélation négative et non significative entre l'activité spécifique de la cathepsine D dans le tissu conjonctif et celle de la cathepsine D dans l'épithélium.

L'axe des ordonnées indique l'activité enzymatique par rapport à l'ADN dans le tissu conjonctif ; l'activité de la cathepsine D par rapport à l'ADN dans l'épithélium est donnée par l'axe des abscisses.

4. Discussion

=====

4.1. Séparation épithélium-conjonctif

Depuis de nombreuses années, plusieurs techniques ont été mises au point pour séparer l'épithélium du conjonctif. MEDAWAR (46), en 1941, fut le premier à réaliser, sur des biopsies de peau, la séparation des deux tissus par des moyens enzymatiques (19). Par la suite, cette séparation a été obtenue grâce à des agents chimiques, tels certains acides organiques, appliqués aux tissus sous-muqueux (3). On a également recouru à des moyens physiques, en pratiquant l'hyperextension de la biopsie (61), qui entraîne une rupture de cohésion de la membrane basale, ou encore en provoquant un décollement épithélial par succion (10).

Ainsi que nous l'avons décrit au chapitre "matériel et méthodes", nous avons séparé chaque biopsie en trois parties au moyen d'un scalpel, selon une modification de la technique utilisée par LOWRY (44) et GOGGINS et BILLUPS (23). Cette dissection de coupes épaisses lyophilisées, réalisée avec précision, nous a permis d'obtenir du tissu épithélial seul (zone superficielle), un mélange de digitations épithéliales et conjonctives (zone moyenne) et du tissu conjonctif pur (zone profonde). Cette méthode préserve en outre l'intégrité des systèmes enzymatiques. Mentionnons que FIRFAROVA et OREKHOVICH (20) font mention d'une inactivation partielle de la cathepsine D par stockage sous lyophilisation, sans donner cependant d'autres précisions.

Mc KINNEY, PASHLEY, SINGH, FRITZ et POWELL (45) ont séparé au scalpel l'épithélium du conjonctif d'une gencive fraîche; cette technique ne permet cependant pas d'obtenir des tissus homogènes car, sur une coupe de tissus à l'état frais, il n'est possible de faire qu'un seul trait de scalpel dans la zone des digitations épithéliales. En outre, la manipulation des tissus que cette technique exige peut entraîner le risque d'une dénaturation enzymatique.

Les moyens chimiques et physiques décrits ci-dessus n'ont pas pu être utilisés non plus pour cette expérimentation par le fait qu'ils causent également une altération des systèmes enzymatiques.

4.2. Activité libre - activité totale

Après l'homogénéisation d'un tissu frais, les analyses d'activité enzymatique fournissent des valeurs correspondant à l'activité des enzymes extralysosomales (activité libre) ; en effet, les lysosomes sont encore pratiquement intacts et leur contenu échappe à l'analyse. Lorsque les parois lysosomales sont détruites, par exemple avec un détergent du type Triton X-100

(HASEGAWA et CIMASONI (26)), l'activité enzymatique totale (enzymes extralysosomales + intralysosomales) peut par contre être mesurée.

Pour nos analyses, nous avons choisi de déterminer l'activité totale de la cathepsine D : le traitement que nous avons fait subir à nos biopsies (congélation, lyophilisation, réchauffement) avant les analyses avait certainement endommagé, dans une certaine mesure, les parois lysosomales, rendant ainsi impossible la détermination de l'activité libre.

4.3. Choix de l'ADN comme base de référence

L'acide désoxyribonucléique ne se trouve pratiquement que dans les noyaux des cellules : par conséquent, la teneur en ADN d'un échantillon tissulaire traduira assez précisément, par référence à une courbe standard, la cellularité d'un tissu. Par ce moyen, la substance intercellulaire n'est pas prise en considération du fait qu'elle ne contient pas d'ADN.

Dans leur étude, faite également sur du matériel gingival humain lyophilisé, GOGGINS et BILLUPS (23) ont découvert que l'activité de la β -glucuronidase augmentait en fonction de l'inflammation lorsque la base de référence était le poids sec de gencive, tandis qu'elle restait inchangée lorsque l'on considérerait l'ADN comme base de référence. Cela signifie que l'augmentation de l'activité de la β -glucuronidase en fonction de l'inflammation, dans le tissu conjonctif, est probablement due à une élévation du nombre de cellules par unité de volume plutôt qu'à une augmentation réelle de la synthèse de l'enzyme. Nos résultats avec la cathepsine D, au contraire, montrent que l'activité spécifique de l'enzyme dans le tissu conjonctif, en prenant l'ADN comme base de référence, augmentait de façon très significative avec l'inflammation gingivale. Ceci signifie qu'une gencive enflammée renferme plus de cathepsine D par unité cellulaire que n'en contient une gencive saine. Il ne nous a toutefois pas été possible de déterminer la localisation intra- ou extracellulaire de l'enzyme, du fait que nous avons mesuré l'activité totale de celle-ci.

Nos résultats confirment ceux de BAEHNI (5) qui a démontré une augmentation des activités spécifiques, par rapport à l'ADN, de la phosphatase acide, phosphatase alcaline, β -glucuronidase et cathepsine D au niveau du produit de rinçage de la gencive pendant une gingivite expérimentale chez l'homme.

Dans le tissu épithélial en revanche, il est intéressant de noter que la cathepsine D diminue avec l'inflammation. Citons à ce propos le travail de CORNAZ, CIMASONI et PATAKI (13), qui ont montré qu'une autre enzyme lysosomale, la phosphatase acide,

se trouvait en plus faible concentration dans une cellule épithéliale d'un tissu enflammé que dans une même cellule d'un tissu sain. Ceci laisse supposer que l'inflammation gingivale est accompagnée d'une libération extracellulaire accrue de l'enzyme.

Lorsque l'activité spécifique est exprimée par rapport au poids sec de tissu, on trouve des corrélations du même genre que celles obtenues avec l'ADN comme base de référence, mais beaucoup moins significatives.

4.4. Origine de la cathepsine D

La détermination de la localisation cellulaire des enzymes lysosomales revêt une grande importance. Depuis longtemps, certaines enzymes telles la β -glucuronidase (29, 37), la phosphatase acide (12, 31, 37, 41, 50, 56) et la N-acétyl-glucosaminidase (37), ont été localisées dans différents types de cellules. Ce n'est qu'en 1972 que POOLE, DINGLE et BARRETT (49) ont pu, pour la première fois, visualiser la cathepsine D par une technique d'immunofluorescence spécifique.

En ce qui concerne l'épithélium, des études en immunofluorescence ont ainsi permis de localiser l'enzyme dans les couches basales et granuleuses de peau de lapin (39) et de poulet (49). Notre technique de dissection des biopsies nous permettant d'obtenir des échantillons de tissu épithélial pratiquement pur, nous avons pu ainsi confirmer la présence de cathepsine D dans les cellules épithéliales.

Quant au tissu conjonctif, on sait que celui-ci est composé d'un ensemble d'éléments cellulaires plus disparates, tels que fibroblastes, granulocytes neutrophiles, monocytes-macrophages, lymphocytes, immunoblastes, plasmocytes et mastocytes (54). La présence de cathepsine D dans ces différents types cellulaires a été rapportée par plusieurs auteurs. LAZARUS et POOLE (39) ont démontré la présence de cathepsine D dans les fibroblastes de lapin. FOLDS, WELSH et SPITZNAGEL (21) ont découvert de la cathepsine D dans les granulocytes polynucléaires de lapins, mais ont nié son existence dans les granulocytes humains. ISHIKAWA et CIMASONI (33) ont cependant tout récemment démontré une activité de la cathepsine D dans ceux-ci, qui peut être estimée à 1/5 de celle des protéases neutres. Plusieurs auteurs (18, 47, 64) s'accordent à donner à la cathepsine D une grande importance dans les processus protéolytiques des macrophages. Dans une étude sur la distribution des protéases dans les tissus lymphoïdes, BOWERS (11) a mis en évidence une population lysosomale nommée L 15, contenant une haute concentration en cathepsine D et appartenant aux cellules des séries lymphocytaires. Aucune recherche ne semble avoir été réalisée quant au contenu en cathepsine D des plasmocytes et mastocytes.

Il est probable que, parmi ces cellules, les leucocytes polynucléaires et les macrophages sont à l'origine de l'augmentation de cathepsine D décrite dans ce travail. Dans une étude morphométrique, SCHROEDER, LINDHE, HUGOSON et MÜNZEL-PEDRAZZOLI (54) ont noté une augmentation particulièrement importante du nombre des leucocytes polynucléaires et des macrophages dans des gencives enflammées de chien. In vitro, il faut rappeler que PAGE, DAVIES et ALLISON (47) ont constaté que les macrophages de péritoine de souris étaient fortement stimulés par des extraits de plaque dentaire et relâchaient plus de 80 % de leurs hydrolases lysosomales dans le milieu extracellulaire.

En conclusion, nous avons constaté que, dans le tissu conjonctif de gencives humaines chroniquement enflammées, il se produisait une élévation, proportionnelle au degré de l'inflammation gingivale, de l'activité spécifique / ADN de la cathepsine D. Nous pouvons supposer que ceci est le résultat d'une synthèse accrue de cette enzyme lysosomale, dont l'accumulation peut contribuer à l'affaiblissement des tissus de soutien de la dent.

10. BLANK, I.H. and MILLER, O.G.A.
A method for the separation of the epidermis
from the dermis.
J. Invest. Dermatol. 15 : 9-10 (1950)
11. BOWERS, W.E. Distribution of tissue proteinases in lymphoid
tissue. In : Tissue Proteinases.
Chapter 10 : 221-239 (Barrett, A.J., Dingle, J.T.
editors) North-Holland Publishing Co (1971)
12. CABRINI, R.L. and CARRANZA, F.A.
Histochemical distribution of acid phosphatase
in human gingiva.
J. Periodont. 29 : 34-37 (1958)
13. CORNAZ, A., CIMASONI, G. and PATAKI, A.
Decrease of acid phosphatase activity in the
epithelial cells from inflamed gingivae.
Experientia 30 : 143-144 (1974)
14. DE DUVE, Ch. The lysosome.
Sci. Amer. 208 : 64-72 (1963)
15. DINGLE, J.T. Electron microscopy of the vacuolar apparatus.
In : Lysosomes.
p. 153-199. (Dingle, J.T. editor) North-Holland
Publishing Co. Amst-London (1972)
16. DINGLE, J.T. Protein catabolism
In : Lysosomes in biol. and pathol.
p. 228-233. (Dingle, J.T. editor) North-Holland
Publishing Co. Amst-London (1973)
17. DINGLE, J.T., BARRETT, A.J. and WESTON, P.D.
Cathepsin D : characteristics of immunoinhibi-
tion and the confirmation of a role in carti-
lage breakdown.
Biochem. J. 123 : 1-13 (1971)
18. DINGLE, J.T., POOLE, A.R. and LAZARUS, G.S.
Immunoinhibition of intracellular protein
digestion in macrophages.
J. Exp. Med. 137 : 1124-1141 (1973)

19. FELTON, J.H., PERSON, P. and STAHL, S.S.
Biochemical and histochemical studies of aerobic oxidative metabolism of oral tissues.
II : enzymatic dissection of gingival and tongue epithelia from connective tissue.
J. Dent. Res, 44 : 392-401 (1965)
20. FIRFAROVA, K.F. and OREKHOVICH, V.N.
On inactive precursor of cathepsin D from chicken liver.
Biochem.biophys.res.comm., 45 : 911-916 (1971)
21. FOLDS, J.D., WELSH, I.R.H., SPITZNAGEL, J.K.
Neutral proteases confined to one class of lysosomes of human polymorphonuclear leucocytes.
PSEBM 139 : 461-463 (1972)
22. FUKUHARA, M. Modifications of collagen and non fibrillar proteins and cathepsin activity in the carrageenin granuloma.
Path. Biol. 20 (21-22) : 887-893 (1972)
23. GOGGINS, J.F. and BILLUPS, L.C.
Cytochemical measurements of β -glucuronidase activity in normal and inflamed human gingiva.
J. Histochem. Cytochem. 19 (7) : 416-420 (1971)
24. GUSTAFSON, G.T. Increased susceptibility to periodontitis in mink affected with a lysosomal disease.
J. Periodont. Res. 4 : 259-267 (1969)
25. HARTLEY, B.S. Proteolytic enzymes.
Ann. Rev. Biochemic. 29 : 45-72 (1960)
26. HASEGAWA, K. and CIMASONI, G.
Determination of free amounts of free and latent acid hydrolases in homogenates of human gingiva.
Arch. Oral biol. 20 : 521-526 (1975)
27. HASEGAWA, K., CIMASONI, G. and VUAGNAT, P.
Inflamed gingivae contain more free lysosomal enzyme.
Experientia 31 : 765-766 (1975)

28. HAWKINS, D. Neutrophilic leukocytes in immunologic reactions : evidence for the selective release of lysosomal constituents.
J. Immunol. 108 (2) : 310-317 (1972)
29. HAYASHI, M. Distribution of β -glucuronidase activity in rat tissues employing the naphtol AS-BI glucuronide hexazonium pararosanilin method.
J. Histochem. Cytochem. 12 : 659 (1964)
30. HEISSMEYER, H., STEIN, U. und STRASSER, K.
Zum katabolen Proteinstoffwechsel menschlicher Leukozyten : saure Carboxypeptidase und Kathepsin D in normalen und pathologisch veränderten Leukozyten.
Blut. 23 : 228-232 (1971)
31. HELMINEN, H.J. and ERICSSON, J.L.E.
Effects of enforced milk stasis on mammary gland epithelium, with special reference to changes in lysosomes and lysosomal enzymes.
Exp. cell. res. 68 : 411-427 (1971)
32. IODICE, A.A., CHIN, J., PERKER, S. and WEINSTOCK, I.M.
Cathepsins A,B,C,D, and autolysis during development of breast muscle of normal and dystrophic chickens.
Arch. bioch. bioph. 152 : 166-174 (1972)
33. ISHIKAWA, I. and CIMASONI, G.
Isolation of cathepsin D from human leucocytes.
Biochim. Biophys. Acta 480:228-240(1977)
34. ISHIKAWA, I., CIMASONI, G. and AHMAD-ZADEH, C.
Possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis of periodontitis : A study on cathepsin D in human gingival fluid.
Arch. Oral Biol. 17 : 111-117 (1972)
35. KEILOVA, H. On the specificity and inhibition of cathepsins D and B. In : Tissue Proteinases.
Chapter 3 : 45-56 (Barrett, A.J. and Dingle, J.T. editors), North-Holland Publishing Co (1971)

36. KISSANE, J.M. and ROBINS, E.
The fluorometric measurements of desoxyribo-
nucleic acid in animal tissues with special
reference to the central nervous system.
J. Biol. Chem. 233 : 184-188 (1958)
37. LANGE, D.E. and SCHROEDER, H.E.
Structural localization of lysosomal enzymes
in gingival sulcus cells.
J. Dent. Res. 51 : 272-278 (1972)
38. LAZARUS, G.S. and DINGLE, J.T.
Cathepsin D of rabbit skin : an immunoenzymic
study.
J. Invest. Dermatol. 62 : 61-66 (1974)
39. LAZARUS, G.S. and POOLE, A.R.
Immunocytochemical localization of cathepsin
D in rabbit skin.
Arch. Dermatol. 111(9) : 1150-1153 (1975)
40. LEHNER, T.
Cell-mediated immune responses in oral disease:
a review.
J. Oral. Pathol. 1 : 39-58 (1972)
41. LISANTI, V.F.
Hydrolytic enzymes in periodontal tissues.
Ann. New York Acad. Sci. 85 : 461-466 (1960)
42. LOE, H.
The gingival index, the plaque index and the
retention index system.
J. Periodont. 38 : 610-616 (1967)
43. LOE, H., THEILADE, E. and JENSEN, B.
Experimental gingivitis in man.
J. Periodont. 36 : 177-187 (1965)
44. LOWRY, O.H.
The quantitative histochemistry of the brain.
J. Histochem. Cytochem. 1 : 420-428 (1953)
45. Mc KINNEY, R.V., PASHLEY, D.H., SINGH, B., FRITZ, B.D. and
POWELL, J.N.
Separation of sulcular gingiva into epithelial
and connective tissue portions.
J. Dent. Res. 53(1) : 148 (1974)

46. MEDAWAR, P.B. Sheets of pure epidermal epithelium from human skin.
Nature 148 : 783 (1941)
47. PAGE, R.C., DAVIES, P. and ALLISON, A.C.
Effects of dental plaque on the production and release of lysosomal hydrolases by macrophages in culture.
Arch. Oral Biol. 18 : 1481-1495 (1973)
48. PAGE, R.C. and SCHROEDER, H.E.
Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work.
Laboratory Invest. 33(3) :235-249 (1976)
49. POOLE, A.R., DINGLE, J.T. and BARRETT, A.J.
The immunocytochemical demonstration of cathepsin D.
J. Histochem. Cytochem. 20 : 261-265 (1972)
50. QUINTARELLI, G. Histochemistry of mucous membranes.
Ann. Histochemistry. 7 : 47-50 (1962)
51. RAPP, G.W. and ORZOLEK, L.M.
Protease activities of normal and inflamed human gingiva.
J. Periodont. 37 : 331-334 (1966)
52. RHEINHARZ, A. and ROTH, M.
Studies on pituitary cathepsin D with artificial substrates.
Enzyme 12 : 458-466 (1971)
53. SAPOLSKY, A.I., ALTMAN, R.D., WOESSNER, J.F. and HOWELL, D.S.
The action of cathepsin D in human articular cartilage on proteoglycans.
J. Clin. Invest. 52 : 624-633 (1973)
54. SCHROEDER, H. E., LINDHE, J., HUGOSON, A., MÜNZEL-PEDRAZZOLI, S.
Structural constituents of clinically normal and slightly inflamed dog gingiva. A morphometric study.
Helvet. Odont. Acta. 17 : 70-83 (1973)

55. SCHWABE, Ch. and SWEENEY, S.C.
The specificity of a bovine fibroblast cathepsin
D. 1 : Action on the S-sulfo derivatives of the
insuline A and B chains and of porcine glucagon.
Biochim. Biophys. acta. 284 : 465-472 (1972)
56. SILVERMAN, S. Jr; KEARNS, G.
Ultrastructural localization of acid phosphatase
in human buccal epithelium.
Arch. Oral Biol. 15 : 169-177 (1970)
57. STEUBE, W.
Etude longitudinale de certains composants du
produit de rinçage du sillon gingivo-dentaire.
Médecine et Hygiène. Thèse 312 (1974)
58. THEILADE, E., WRIGHT, W.H., JENSEN, B. and LOE, H.
Experimental gingivitis in man. II : A longitu-
dinal clinical and bacteriological investiga-
tion.
J. Periodont. Res. 1 : 1-13 (1966)
59. TYNELIUS-BRATTHALL, G. and ATTSTRÖM, R.
Acid phosphatase, hyaluronidase and protease
in crevices of healthy and chronically inflamed
gingivae in dogs.
J. Dent. Res. 51 : 279-289 (1971)
60. VALAZZA, A., MATTER, J., OGILVIE, A. et CIMASONI, G.
Fluide gingival, inflammation gingivale, profon-
deur des poches et perte osseuse.
Rev. Mens. Suisse Odontostomatol. 82 : 824-832,
(1972)
61. VAN SCOTT, E.J. Mechanical separation of the epidermis from the
corium.
J. Invest. Derm. 18 : 377-379 (1952)
62. WEBER, R.
Behaviour and properties of acid hydrolases in
regressing tails of tadpoles during spontaneous
and induced metamorphosis in vitro.
Ciba Found. Symp. Lysosomes : 282-300 (1963)
63. WEISSMANN, C. The role of lysosomes in inflammation and
disease.
Ann. Rev. Med. 18 : 97-112 (1967)

64. WEISSMANN, G., DUKOR, P. and ZURIER, R.B.
Effects of cyclic AMP on release of lysosomal
enzymes from phagocytes.
Nature New Biol. (London) 231 : 131 (1971)
65. WEISSMANN, G., ZURIER, R.B. and HOFFSTEIN, S.
Leukocytic proteases and the immunologic
release of lysosomal enzymes.
Amer. J. Pathol. 68(3) : 539-559 (1972)
66. WOESSNER, J.F. Jr. Formation and breakdown of collagen and
elastin in the human uterus during pregnancy
and post-partum involution.
Biochem. J. 89 : 75-82 (1963)
67. WOESSNER, J.F. Jr. Cathepsin D : enzymic properties and role
in connective tissue breakdown.
In : Tissue Proteinases.
Chapter 13 : 291-307 (Barrett, A.J. and Dingle,
J.T., editors) . North-Holland Publishing Co.
(1971)

